



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

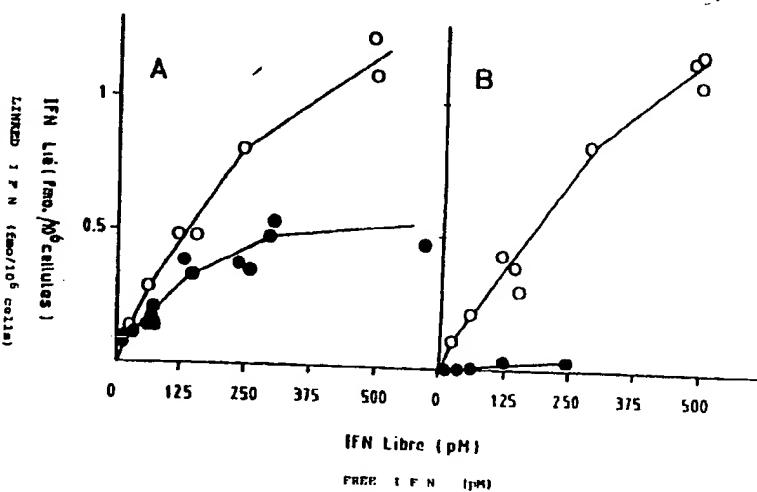
(51) Classification internationale des brevets 5 : C12N 15/12, C07K 13/00 C12N 5/10, C12P 21/08 G01N 33/566, 33/577, 33/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/05862 (43) Date de publication internationale: 2 mai 1991 (02.05.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00758 (22) Date de dépôt international: 19 octobre 1990 (19.10.90)		(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).	
(30) Données relatives à la priorité: 89/13770 20 octobre 1989 (20.10.89) FR		(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.	
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): MOGENSEN, Knud, Erik [DK/FR]; 18, rue des Gobelins, F-75013 Paris (FR). UZE, Gilles [FR/FR]; 180, boulevard Voltaire, F-75011 Paris (FR). LUTFALLA, Georges [FR/FR]; 5 bis, rue de Solférino, F-75007 Paris (FR). GRESSER, Ion [US/FR]; 11, rue Monsieur, F-75007 Paris (FR).			

(54) Title: **cDNA FRAGMENT CODING THE ALPHA INTERFERON RECEPTOR GENE AND PROCESS FOR THE PREPARATION OF A CORRESPONDING PROTEIN**

(54) Titre: **FRAGMENT D'ADNc CODANT POUR LE GENE DU RECEPTEUR DE L'INTERFERON ALPHA ET PROCEDE DE PREPARATION D'UNE PROTEINE CORRESPONDANTE**

(57) Abstract

The invention relates to the human alpha receptor interferon and to the DNA sequence, in particular the cDNA sequence, characterized by the fact that it codes for the alpha interferon receptor gene. Furthermore, the invention relates to the non human cells which express said receptor, to a process for obtaining said cells, to a process for the preparation of a protein corresponding to said fragment, to the protein thus obtained, and to the antibodies raised against said protein. The invention also relates to diagnostic kits based on said receptor and to the use of said receptor to identify human alpha IFN agonists.



(57) Abrégé

La présente invention se rapporte au récepteur de l'interféron alpha humain et à la séquence d'ADN, notamment une séquence d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle code pour le gène du récepteur de l'interféron alpha. L'invention concerne en outre les cellules non humaines exprimant ledit récepteur, un procédé d'obtention desdites cellules, un procédé de préparation d'une protéine correspondant audit fragment d'ADN, la protéine ainsi obtenue, et les anticorps dressés contre cette protéine. L'invention a également pour objet des kits de diagnostic à base dudit récepteur et l'utilisation de ce même récepteur à la mise en évidence d'agonistes de l'IFN alpha humain.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures
publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MR	Mauritanie
BE	Belgique	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NO	Norvège
BJ	Bénin	HU	Hongrie	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	SD	Soudan
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SU	Union soviétique
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

- 1 -

FRAGMENT D'ADNc CODANT POUR LE GENE DU RECEPTEUR DE L'INTERFERON ALPHA ET PROCEDE DE PREPARATION D'UNE PROTEINE CORRESPONDANTE

La présente invention se rapporte à la séquence, notamment à une séquence d'ADNc codant pour le gène du récepteur de l'interféron alpha.

L'interféron est un terme générique désignant trois classes 5 antigéniques : alpha, bêta et gamma, de protéines capables, entre autres, d'induire un état antiviral et d'inhiber la multiplication des cellules sensibles.

Il existe entre les interférons alpha et bêta, qui sont produits 10 à la suite d'infection virale, une homologie de structure suffisamment forte pour que ces deux types d'interféron puissent réagir par voie du même récepteur cellulaire.

L'interféron alpha humain est lui-même un mélange d'une 15 douzaine de protéines à fort pourcentage d'homologie, codées par des gènes de structure différente. Ces sous-types ont un spectre de fonction identique mais leurs activités spécifiques sont différentes.

L'interféron gamma, qui est produit par les lymphocytes activés, ne possède aucune homologie avec les interférons alpha/bêta et il ne réagit pas avec leur récepteur.

Actuellement, les structures des interférons (qui possèdent 20 environ 165 acides aminés) sont assez bien connues au niveau de leur séquence d'acides aminés et plusieurs études ont été dirigées vers l'analyse des domaines fonctionnels de ces protéines. Des molécules hybrides, construites entre les interférons de haute et de basse affinité en utilisant des sites de restriction de l'ADN codant pour ces interférons, ont été 25 utilisées pour montrer que la partie N-terminale de la molécule déterminait l'affinité de liaison avec son récepteur cellulaire et par conséquence, l'activité spécifique des interférons alpha.

Les maladies respiratoires d'origines virales posent d'importants problèmes économiques pour la santé publique. Les essais cliniques 30 ont montré que l'interféron alpha protège à 100 % des volontaires infectés par différents rhinovirus. De même, il a été mis en évidence que parmi les volontaires traités à l'interféron alpha et infectés par un coronavirus, 6 % ont développé les symptômes du rhume comparé à 37 % des volontaires traités par placebo.

Néanmoins, quoique l'interféron alpha humain se montre efficace dans ces essais, la toxicité qu'il exerce sur la muqueuse nasale pose un problème majeur.

5 L'interféron possède également une activité antitumorale chez l'homme et à l'heure actuelle il est devenu le traitement de choix pour certains cancers. Cependant, l'interféron injecté par voie générale exerce également une toxicité pour le système nerveux ce qui limite les possibilités de traitement.

10 En fait, actuellement, il n'y a aucun moyen pour déterminer quel devrait être l'interféron à utiliser pour obtenir une activité thérapeutique et une toxicité réduite. Plusieurs laboratoires ont déployé des efforts considérables pour construire des interférons modifiés qui auraient une activité prononcée accompagnée d'une faible toxicité. Cette approche s'est révélée décevante.

15 Il est maintenant évident que le succès éventuel d'un tel projet nécessite la connaissance de la structure du récepteur des interférons pour imaginer la construction de l'agoniste. Un agoniste ayant une activité élevée et une faible toxicité pour la muqueuse nasale trouverait un marché très important pour le traitement des maladies respiratoires d'origines virales.

20 C'est pourquoi, la présente invention concerne plus particulièrement l'obtention d'une protéine ayant la structure du récepteur de l'interféron alpha et son expression, notamment en surface de cellules ainsi que les séquence d'ADN codant pour ladite protéine.

25 La présente invention se rapporte donc tout d'abord au récepteur de l'interféron alpha humain caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence de la figure 4 ou à l'un de ses variants alléliques qui n'en diffère pas par plus de 3 acides aminés.

30 Parmi ces variants alléliques, il peut s'agir de la séquence de la figure 4 dans laquelle la thréonine en position 164 est remplacée par une arginine et un acide aspartique est inséré entre l'acide aspartique en position 479 et l'acide glutamique en position 480.

La présente invention concerne également une séquence d'ADN codant pour le récepteur de l'interféron alpha humain.

Cette séquence d'ADN sera de préférence conforme à la séquence de la figure 4 ou à une séquence allélique de celle-ci.

La structure de la séquence d'ADN codant pour le récepteur de l'interféron alpha-humain est analysée dans les exemples. Elle comporte notamment un peptide signal. Dans certains cas, ce peptide signal pourra être supprimé ou remplacé par un autre peptide signal mais dans la plupart des cas, on préfèrera garder ce peptide signal de la figure 4 et donc la séquence codante correspondante.

Cette séquence est de préférence insérée dans un système assurant son expression cellulaire dans une cellule hôte appropriée, en particulier au niveau transmembranaire.

En particulier, la présente invention concerne le fragment d'ADN, notamment le fragment d'ADNc, caractérisé en ce qu'il code pour le gène du récepteur de l'interféron alpha. Il sera notamment conforme à la séquence de la figure 4 ou à une séquence allélique de celle-ci.

Il peut ainsi s'agir de la séquence d'ADN de la figure 4 dans laquelle la cytosine en position 569 est remplacée par une guanine et un codon TGA inséré entre l'adenine situé en position 1514 et la thymine en position 1515.

La présente invention se rapporte également aux cellules non humaines caractérisées en ce qu'elles expriment ledit récepteur de l'interféron alpha humain et à un procédé d'obtention desdites cellules.

Selon ce procédé on transfecte ou infecte des cellules hôtes compatibles avec un élément d'ADN comportant une séquence d'ADN codant pour ledit récepteur, ainsi que les éléments susceptibles d'assurer l'expression de cette séquence dans ladite cellule.

Les exemples ci-après démontrent comment cette séquence codant pour le récepteur de l'interféron alpha humain (IFN-alpha h) a pu être exprimée dans des cellules de mammifères non humains, notamment de souris. Les techniques permettant l'expression cellulaire de séquences d'ADN exogènes sont connues. Il peut s'agir suivant les cellules hôtes d'utiliser des vecteurs autoréplicatifs tels que les plasmides ou bien des vecteurs intégratifs, séquences d'ADN ou virus vecteurs par exemple. Dans

le cas où l'on souhaite obtenir une lignée cellulaire exprimant le récepteur IFN-alpha humain, la technique mise en oeuvre peut être à faible rendement puisqu'on ne recherche qu'une lignée. Par contre, lorsque l'on souhaite obtenir la protéine seule, on utilisera de préférence les vecteurs assurant une amplification notamment les vecteurs plasmidiques comportant une origine de réPLICATION ou bien les systèmes d'intégration multicopies.

La présente invention concerne en outre un procédé de préparation de récepteurs d'IFN alpha humain.

Ainsi, lorsque l'on souhaitera obtenir la protéine seule on pourra cultiver, en milieu de culture approprié, des cellules hôtes transformées, transfectées ou infectées par un vecteur d'expression de ladite protéine, comportant une séquence d'ADN codant pour ledit récepteur, sous le contrôle d'un promoteur de la transcription de cette séquence dans l'hôte ainsi que les éléments assurant la traduction de la protéine puis, séparer la protéine obtenue par tout moyen approprié.

Cette protéine pourra servir pour préparer des anticorps, notamment des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur ; la technologie correspondante ne sera pas décrite en détails car il s'agit d'une technique connue.

L'invention permet donc d'obtenir :

- le récepteur de l'interféron alpha humain,
- les anticorps dirigés contre ce récepteur, et
- des cellules exprimant ledit récepteur.

Les applications de ces éléments sont très variées. Tout d'abord le récepteur seul ou exprimé à la surface d'une cellule peut permettre de tester les analogues de l'interféron alpha humain afin de déterminer les meilleurs agonistes.

Ce type de test peut également être envisagé grâce à la protéine correspondante fixée sur un support solide tel que plaques, billes, etc... Il s'agit de techniques qui sont déjà connues pour d'autres récepteurs ou bien pour les dosages antigène-anticorps.

Les dosages récepteurs agonistes peuvent être effectués par mesure de la fixation directe ou bien par mesure des déplacements qui permettent d'évaluer l'affinité de l'agoniste par rapport à un composé de référence, par exemple l'IFN alpha humain.

5 Les anticorps pourront être utilisés au dosage des récepteurs ou à leur visualisation dans le cas de l'imagerie. Il s'agit là de techniques permettant d'évaluer certains états pathologiques par exemple justifiant un traitement à l'interféron alpha ou permettant d'évaluer certains états dans lesquels le taux de ces récepteurs varie.

10 L'invention concerne donc également des trousseaux de diagnostic comprenant un ou plusieurs des éléments précédents à titre d'agent de diagnostic ou d'imagerie, ou à titre de modèle pharmacologique pour tester les produits dérivant de l'interféron alpha humain.

15 La protéine du récepteur ou les anticorps correspondants peuvent également être utilisés à titre d'agent pharmacologique lorsque l'on souhaitera bloquer les récepteurs d'IFN alpha humain ou bien lorsque l'on utilisera la protéine à titre deurre pour bloquer l'IFN alpha humain dans certains états où l'hyperexpression de l'interféron alpha humain peut être nuisible.

20 Enfin, les anticorps pourront être utilisés comme agent de pilotage pour insérer un principe actif couplé à cet anticorps au voisinage d'un récepteur de l'IFN alpha humain.

25 Les exemples et figures donnés ci-dessous à titre non limitatif permettront de mettre en évidence d'autres avantages et caractéristiques de la présente invention.

La figure 1 représente les courbes de liaison de l'interféron humain alpha B (symboles noirs) ou de l'hybride BDDB (symboles blancs) sur le transfectant primaire 10BH7 (A) ou sur les cellules parentales BTG 9A (B).

30 Les figures 2 représentent l'analyse en "Southern blot" de l'ADN génomique des transfectants primaires et secondaires.

Figure 2A :

Puit n°1 : Digestion EcoRI de l'ADN du clone primaire 10BH7 hybridé avec une sonde Alu.

Puit n° 2 : même ADN hybridé avec une sonde Lambda.

Figure 2B :

5 Puits n° 1 et 3 : Digestion BamHI de l'ADN des deux transfectants secondaires 1B4D10 et 2A415 hybridé avec une sonde Alu.

Puits n° 2 et 4 : Digestion BamHI de l'ADN de deux transfectants secondaires négatifs hybridé avec une sonde Alu.

10 Puit n° 5 : Digestion BamHI de l'ADN des cellules parentales BTG 9A hybridé avec une sonde Alu.

La figure 3 représente l'analyse en "northern blot" des ARN polyA+ des deux transfectants secondaires (puits n° 1 et 3) et des cellules parentales (puits n°2), hybridé avec la sonde Eco RI 5 kb.

15 La figure 4 représente la séquence nucléotidique de l'ADNc du récepteur de l'interféron humain alpha ainsi que sa séquence en acide aminé. Le peptide signal et la région transmembranaire sont encadrés. Les sites de glycosylation liés à l'azote sont soulignés par des tirets. Les deux sites de polyadénylation et le site de restriction Sma I sont soulignés.

20 EXEMPLE 1 :

Sélection de cellules de souris BTG transfectées sensibles à l'interféron alpha B humain.

25 Des cellules BTG 9A de souris sont co-transfектées avec une banque d'ADNc humain clonée dans un vecteur d'expression phage lambda de mammifères contenant également le gène neo bactérien et de l'ADN génomique Daudi de haut poids moléculaire, dans un rapport 1 : 1. Ce système de co-transfection où l'expression d'un récepteur interféron humain peut provenir de l'ADN humain génomique et/ou de l'ADNc humain est utilisé pour augmenter les chances d'isoler des transfectants intéressants.

30 Des clones de transfectants stables sont sélectionnés dans un milieu G418 avec une fréquence de $10^{-2} - 10^{-3}$. Afin de détecter les clones cellulaires sensibles à l'interféron alpha humain, des clones transfectés sont

traités avec 30 000 unités/ml d'interféron alpha B humain et infectés avec du VSV. A cette concentration, des cellules BTG de souris sont insensibles à l'interféron alpha B, mais un clone transfectant exprimant le gène récepteur de l'interféron alpha humain devrait être à un stade antiviral.

5 Compte tenu du fait que le titre interféron est inversement proportionnel à la multiplicité de l'infection, cette sélection virale permet de neutraliser l'importante quantité de VSV produite par la majorité des clones des cellules inappropriées qui aboliraient l'état antiviral du clone de la cellule intéressante. Cette méthode implique une rapide adsorption du virus sur les cellules suivie d'un traitement avec de l'antisérum anti-VSV de lapin pour neutraliser l'excès du virus, et un développement de l'effet cytopathique dans un antisérum anti-VSV de lapin contenant un milieu de gélose semi-solide. Des clones cellulaires survivants sont individuellement isolés. Pour éviter une infection VSV chronique, les clones de cellules sont 10 soumis à un traitement avec un interféron alpha/béta de souris et l'antisérum anti-VSV est maintenu dans un milieu G-418 durant une semaine. Ils sont ensuite retestés pour leur sensibilité à l'interféron alpha B humain vis-à-vis des infections VSV ou EMC. La plupart de ces clones transfectés sont insensibles à l'interféron alpha B humain. Néanmoins, un clone révèle 15 une sensibilité intéressante à l'interféron alpha B humain. Il est alors sous cloné et appelé 10B H7.

20 On détermine la sensibilité des cellules 10B H7 à de nombreux interférons alpha humains et murins puis on compare le comportement de ces cellules avec les cellules BTG murines parentales.

25 Le tableau I montre l'activité de l'interféron alpha/béta de souris, l'interféron alpha B humain, l'interféron-béta humain et l'interféron gamma humain testés sur des cellules BTG de souris parentales, du clone 10B H7 transfecté et des cellules humaines Wish en utilisant en tant que virus le VSV ou l'EMC.

30 En ce qui concerne l'interféron murin, les cellules 10B H7 sont aussi sensibles que les cellules BTG parentales. D'autre part, les cellules 10B H7 manifestent au moins une sensibilité 64 000 fois plus importante à l'interféron alpha B humain comparées aux cellules parentales. On observe

également une augmentation 8 fois plus importante de l'activité de l'interféron béta humain sur les cellules 10B H7 mais on ne détecte aucune activité antivirale de l'interféron gamma humain qui est reconnu par un récepteur distinct aussi bien sur les cellules BTG parentales que sur le clone 10B H7 transfecté. L'activité antivirale spécifique de l'interféron alpha B ($4.7 \cdot 10^6$ unités/mg) sur les cellules 10B H7 est de l'ordre des activités spécifiques des interférons alpha humains sur les cellules humaines.

10

TABLEAU I

Activités antivirales de préparations d'interféron testées sur : (Unités/ml)					
		BTG	10BH7	WISH	RAPPORT 10BH7/BTG
20	IFN alpha/béta de souris	$12,8 \times 10^6$	$12,8 \times 10^6$	240	1
15	IFN alphaB humain	< 20	$1,27 \times 10^6$	54×10^6	> 64 000
25	IFN béta humain	200	$1,6 \times 10^3$	$2,7 \times 10^6$	8
30	IFN gamma humain	$< 1 \times 10^3$	$< 1 \times 10^3$	20×10^6	---

EXEMPLE 2 :

Transfectants d'une cellule BTG de souris sensibles à l'interféron exprimant le récepteur d'interféron humain.

5

Sur des cellules 10B H7, l'interféron alpha B humain se comporte comme un interféron alpha D sur des cellules humaines, activité spécifique similaire et affinité de liaison apparente similaire. Comme l'interféron alpha D sur des cellules humaines, la liaison de l'interféron alpha B humain sur des cellules 10B H7 peut être mesurée seulement à 37°C.

10

15

On réalise plusieurs expériences de liaison avec de l'interféron alpha B iodé utilisé en tant que sonde pour le récepteur humain et un interféron hybride iodé appelé BDDB qui est actif à la fois sur les lignées de souris parentales et sur le clone 10B H7, en tant que contrôle positif. Cet interféron hybride qui a une activité spécifique sur les cellules de souris, proche de celle de l'interféron alpha B humain sur les cellules 10B H7, pourrait être une sonde pour les récepteurs humains et de souris à la fois sur les cellules BTG parentales et les cellules 10B H7 transfectées.

20

25

La figure I montre que la liaison du BDDB est similaire sur des cellules BTG et 10B H7. Au contraire, les cellules 10B H7, se lient spécifiquement à l'interféron alpha B alors que les cellules BTG ne le font pas. Les paramètres de liaison calculés d'après les données de Scatchard montrent que les cellules 10B H7 expriment environ 500 sites de liaison par cellule pour l'interféron alpha B avec un K_d apparent de 2.10^{-10} M. Ceci est proche des valeurs de l'interféron BDDB (1 500 sites de liaison par cellule ; K_d apparent 5.10^{-10} M), qui est actif à la fois sur les lignées de souris parentales et sur le clone 10B H7.

30

En conclusion, ces résultats complétés avec d'autres études, indiquent que l'interféron alpha B humain se lie avec un récepteur spécifique sur les cellules 10B H7 et non pas sur les cellules des souris parentales.

EXEMPLE 3 :**Clonage d'une sonde couvrant le gène du récepteur interféron alpha humain dans des clones d'une cellule transfectée secondaire**

5

Partant de l'hypothèse que les cellules 10B H7 expriment un gène humain transfecté nécessaire pour conférer des sites de liaison et une activité antivirale de l'interféron alpha B sur une cellule de souris, il a été recherché la distribution de l'ADN humain dans le génome 10B H7 transfecté.

10

La figure 2A est un "southern blot" avec l'ADN du clone 10B H7 utilisant soit une séquence Alu humaine détectant l'ADN génomique humain soit une sonde à ADN lambda pour détecter l'ADNc intégré.

15

On a ainsi montré que les transfectants avaient intégré plus qu'une part de 1000 de l'ADN Daudi humain et 100 copies de l'ADNc humain de la banque d'expression des mammifères. En raison de l'importante quantité d'ADN humain dans ce clone, il a été nécessaire d'isoler des transfectants secondaires afin de cloner la séquence d'ADN responsable de l'expression du récepteur dans le clone 10B H7 initial. Dans ce but, on a co-transfектé des cellules de souris BTG avec de l'ADN génomique du clone 10B H7 et du neopSV2. Les cellules sensibles à l'interféron humain ont été isolées. Les transfectants secondaires stables sont soumis à 4 cycles de traitement de l'interféron alpha B et à l'infection VSV. Après sous clonage, il a été obtenu deux clones secondaires indépendants 1B4D10 et 2A415. Ces deux clones secondaires sont indépendants mais dérivent du même clone initial. Ils ont les mêmes caractéristiques que celles du clone initial 10B H7, c'est-à-dire sensibilité à l'interféron alpha humain et récepteur d'expression à leur surface. Ces deux clones secondaires ne retiennent pas les séquences associées aux phages lambda dans leur génome et en conséquence l'expression des récepteurs de l'interféron alpha humain est dû à l'ADN.

20

25

30

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	- Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
	expression of its cDNA", pages 225-234 voir le document en entier ---	
A	Biochemical and Biophysical Research Communications, volume 107, no. 3, 16 août 1982, Academic Press, Inc., (New York, US), C.J. Epstein et al.: "Direct evidence that the gene product of the human chromosome 21 locus, IFRC, is the interferon-alpha receptor", pages 1060-1066 voir le document en entier ---	14-15
A	Proceedings National Academy Science, volume 81, septembre 1984, (US), A. Raziuddin et al.: "Receptors for human alpha and beta interferon but not for gamma interferon are specified by human chromosome 21", pages 5504-5508 voir le document en entier -----	14-15